Istituto di Patologia Generale ed Immunologia della R. Università Adriatica
« B. Mussolini » di Bari
(Direttore Prof. A. Marrassini)

Sulla influenza esercitata dal bloccaggio del sistema reticolo - endoteliale nella produzione di anticorpi

II. - Agglutinine

Ricerche sperimentali

per il Dott. Aldo Cionini, *Aiuto*

Estratto dal *Giornale di Batteriologia e Immunologia*
Anno II, n. 10 (Ottobre 1927)

TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
Via Superga, n. 15 - Torino

Istituto di Patologia Generale ed Immunologia della R. Università Adriatica
« B. Mussolini » di Bari
(Direttore Prof. A. Marrassini)

Sulla influenza esercitata dal bloccaggio del sistema reticolo - endoteliale nella produzione di anticorpi

II. - Agglutinine

Ricerche sperimentali

per il Dott. Aldo Cionini, *Aiuto*

Estratto dal *Giornale di Batteriologia e Immunologia*
Anno II, n. 10 (Ottobre 1927)

TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
Via Superga, n. 15 - Torino

In precedenti ricerche, premessa la grande disparità di risultati ai quali erano pervenuti i numerosi ricercatori che avevano studiato la influenza del bloccaggio del S.R.E. sulla produzione dei vari anticorpi, studiai le eventuali variazioni, che, nella produzione degli ambocettori emolitici, fossero state capaci di provocare il bloccaggio del S.R.E., la splenectomia ed ambedue questi procedimenti riuniti insieme nello stesso animale. I risultati delle mie ricerche mi indussero a concludere che solo praticando il bloccaggio con ripetute iniezioni endovenose si può ottenere nel coniglio una diminuzione nella produzione di emolisine, pressochè uguale a quella ottenuta con la sola splenectomia: che l'unione del bloccaggio e della splenectomia negli stessi animali non determina una produzione di emolisine minore di quella ottenuta usando separatamente questi due procedimenti. Partendo dalle medesime premesse ho voluto, colle presenti ricerche, studiare l'influenza esercitata dal bloccaggio del S.R.E. nella produzione di agglutinine.

Non è qui mio compito fare la storia delle numerose ricerche eseguite sull'origine delle agglutinine perchè assai recentemente e molto accuratamente è stata fatta dal Vannucci (1924) e perchè

troppo lontano mi condurrebbe dall'oggetto a cui miro. Mi limiterò solo a ricordare come i risultati di moltissimi AA. (Pfeiffer e Marx 1898, Iatta 1900, Azzurrini 1906, ecc.) avessero sempre più localizzato negli organi emopoietici l'origine di questi anticorpi. Allorchè Aschoff (1922) mise in piena luce il S.R.E. furono eseguite, usando il metodo del bloccaggio, numerose ricerche per vedere se le agglutinine originassero da questo sistema, come fu teoricamente supposto data la sua grande diffusione negli organi emopoietici.

Per conciliare colla brevità l'esposizione della numerosa serie di ricerche e di discordanze esistenti sull'argomento raggrupperò secondo le loro conclusioni i risultati ai quali pervennero coloro che con vari procedimenti di tecnica, praticando o no la splenectomia, studiarono come il bloccaggio del S.R.E. influenzi la produzione di agglutinine.

1) Bieling ed Isaac (1922), Siegmund (1922), Neufeld e Meyer (1924), De Nunno (1924), Gay e Clark (1924), Singer e Adler (1924), Kobayaski e Skiwotsu (1925), ottennero una più o meno marcata diminuzione nella produzione di questi anticorpi.

2) Vannucci (1924), Fränkel e Grunenberg (1924) in complesso ritennero che il bloccaggio non influenzi la loro produzione.

3) Rosenthal, Moses e Petzal (1924), Rocchi (1925) ottennero invece un notevole aumento nella produzione di questi anticorpi.

Le ricerche eseguite in questi ultimi tempi non hanno condotto ancora alla risoluzione definitiva della questione per quanto in complesso concordino almeno nell'ammettere che il blocco del S.R.E. non esercita influenza inibitrice sulla produzione di agglutinine. Kobayaski (1926) in topi bianchi, bloccati con ripetute iniezioni endovenose di saccarato di ferro, non avrebbe osservato nessuna inibizione nella produzione di agglutinine pel bacillo del tifo.

Kowell e Tower (1926) eseguirono il blocco con ripetute iniezioni endovenose di ossisaccarato di ferro e nessuna differenza avrebbero osservato nella produzione di agglutinine pel bacillo del tifo tra i conigli bloccati e quelli di controllo.

Benassi (1926) studiò l'influenza del blocco, unito o no alla intossicazione benzolica ed alla splenectomia, sulla produzione di

agglutinine pel bacillo del tifo. Pel blocco usò separatamente varie sostanze delle quali ha praticato una sola iniezione endovenosa tre ore prima di ciascuna delle tre vaccinazioni che praticava nei conigli. Tra ciascuna vaccinazione interponeva parecchi giorni, durante i quali eseguiva varie titolazioni, le quali gli avrebbero permesso di osservare che il blocco, da solo, tende a favorire la produzione di agglutinine. L'unione della intossicazione benzolica e della splenectomia al bloccaggio non avrebbe dimostrato a questo autore influenza notevole e costante sulla produzione di questi anticorpi.

Warschatoff e Leontjeff (1926) che hanno eseguito il blocco del S.R.E. con varie sostanze avrebbero osservato che tale trattamento non esercita nessuna influenza sulla produzione di anticorpi.

Collon (1927) in conigli bloccati con ripetute iniezioni endovenose di trypanblau o di inchiostro di china avrebbe osservato una minore produzione di agglutinine pel bac. del tifo che nei controlli. L'A. non può stabilire però se tale fatto sia realmente da attribuirsi al blocco del S.R.E. oppure allo stato di sofferenza che i conigli bloccati presentarono in modo marcato.

* * *

La massima parte di coloro, che fino ad ora si sono occupati di questo genere di ricerche, hanno basato le loro conclusioni sul complesso delle differenze esistenti tra il titolo dei sieri degli animali bloccati e quello degli animali di controllo, ed anch'io ho seguito questo logico procedimento nelle già menzionate ricerche sulle emolisine.

Essendo il coniglio l'animale che, per varie ragioni, meglio si presta a questo genere di ricerche ed essendo noto, specie dopo le ricerche di Neri (1916), come la produzione di agglutinine tifiche e coleriche presenti oscillazioni accentuatissime tra un coniglio e l'altro, ho cercato, prima di intraprendere le presenti ricerche, di trovare un mezzo che mi permettesse di eliminare, almeno in gran parte, questo non lieve inconveniente che mi sembra capace di offuscare anche i risultati delle più accurate ricerche.

La massima parte dei precedenti ricercatori, pure non dimostrando in complesso di preoccuparsi troppo di questo inconve-

niente, ha creduto di poterlo parzialmente evitare o facendo uso di animali di peso pressochè uguale o di animali nati dallo stesso parto. Non essendo però riuscito a trovare che sia stata data la dimostrazione sperimentale, che anche animali provenienti dallo stesso parto presentino, come sarebbe logico supporre, se non uguale capacità reattiva, minori variazioni individuali, ho voluto, in ricerche preliminari, rendermi conto personalmente se esistono, e di quale entità siano le eventuali differenze nella produzione di agglutinine tra conigli provenienti dallo stesso parto. Ho fatto così uso di sei giovani conigli dal peso di kg. 1,400-1,700 i quali, oltrechè esser nati dallo stesso parto, si presentavano in ottime condizioni di nutrizione. Per economia di spazio non riporto i protocolli dei risultati ottenuti, ma mi limito a riferire come, in seguito a ripetute iniezioni endovenose di uguale quantità di vaccino antitifico, questi conigli abbiano presentato, differenze individuali marcatissime (fino del 400 %) nella produzione di agglutinine, tali quindi da rendere molto difficile una valutazione, sia pure approssimativa dei risultati ottenuti in ricerche comparative.

Essendosi dimostrata inefficace questa avvertenza agli effetti di poter lavorare su animali che non presentassero eccessive differenze individuali, ho dovuto ricorrere ad un altro espediente.

E' noto che le agglutinine, dopo aver raggiunto un titolo massimo una settimana circa dopo la vaccinazione, diminuiscono lentamente; il Neri le ha trovate molto diminuite 50 giorni dopo l'iniezione vaccinante e fortemente diminuite o quasi scomparse dopo 140 giorni. E' pure noto come, eseguendo in questo periodo una nuova iniezione vaccinante, si ottenga di nuovo un titolo che può raggiungere o superare quello massimo già raggiunto una settimana dopo la prima o le prime vaccinazioni.

Queste nozioni mi hanno suggerito di usare, per realizzare lo scopo prefissomi, il procedimento seguente: vaccinare ripetutamente un certo numero di conigli in modo da ottenere un titolo agglutinante molto elevato, tale da mettere in piena evidenza le differenze individuali nella produzione di questi anticorpi presentate da ciascun animale, e lasciar passare parecchio tempo affinchè il titolo si abbassi fortemente. Quindi, dopo aver diviso in più lotti gli animali a seconda della diversa capacità reattiva da loro presentata, praticare in ciascun coniglio una nuova iniezione di vaccino unita o no al bloccaggio e comparare poi il titolo aggluti-

nante raggiunto dai sieri degli animali bloccati con quello dei rispettivi controlli appartenenti allo stesso lotto. Questo procedimento mi pare permetta di eseguire ricerche su animali nei quali i dislivelli nella produzione di agglutinine, dovuti a differenze individuali, sono ridotti al minimo, talchè riesca anche possibile un apprezzamento sufficientemente esatto dei risultati ottenuti tra gli animali appartenenti allo stesso lotto.

Di questo procedimento avrei anche voluto fare uso quando studiai l'influenza esercitata dal bloccaggio sulla produzione di emolisine. Ma essendomi noto per ricerche altrui ed anche per esperienza diretta come gli eritrociti eterogenei siano ottimi anafilattogeni per il coniglio e come ripetute iniezioni di questi possano, specie ad una certa distanza di tempo, provocare in questo animale fenomeni anafilattici i quali, anche se non sempre mortali, possono far diminuire il contenuto del siero in anticorpi (Iachimoglu, Hilda Hempl, Andriani ecc.), rinunziai ad usare il procedimento suddetto.

* * *

Ciò premesso, prima di descrivere particolarmente gli esperimenti eseguiti sullo schema suddetto e prima di esporre i risultati ottenuti, accennerò brevemente alla tecnica sperimentale da me seguita.

Per antigene ho fatto uso di bacilli del tifo distaccati da una patino-cultura di 20-24 ore su agar fresco sospesi in cc. 12 di soluzione di cloruro sodico al 0,85 % ed uccisi tenendoli per una ora a 60° C.

Di questa sospensione ho iniettato cc. 0,5 in una delle vene auricolari di ogni coniglio. Ho fatto uso della via endovenosa perchè il vaccino seguisse la stessa via della sostanza bloccante e venisse quindi a contatto con gli stessi elementi cellulari e perchè essa è ritenuta la più adatta (Missiroli, Neri) per ottenere un alto titolo agglutinante.

Non ho creduto necessario eseguire un conteggio dei germi iniettati, dato che l'iniezione vaccinante veniva eseguita ogni volta con la stessa sospensione in tutti gli animali ed a scopo esclusivamente comparativo.

Nei conigli da sottoporsi al bloccaggio l'iniezione di vaccino

fu praticata circa un'ora dopo la prima iniezione di sostanza bloccante. Risultando dagli studi di vari autori (Okuneff, Vannucci ecc.) che la sostanza bloccante è già abbondantemente immagazzinata nel S.R.E. entro circa mezz'ora dopo la sua iniezione, ho creduto razionale interporre, tra le due iniezioni, circa un'ora per aver maggiore sicurezza che il vaccino trovasse la sostanza bloccante completamente immagazzinata nei vari elementi del S.R.E.

Come per le precedenti ricerche sulle emolisine ho usato, come sostanza bloccante, il Pyrrolblau (Grubler) per il quale i conigli mi avevano dimostrato un'ottima tolleranza. La soluzione all'1,5 per cento in acqua distillata e soluzione fisiologica veniva filtrata, sterilizzata ed iniettata in una delle vene auricolari. I salassi furono praticati dall'orecchio non iniettato, tranne il secondo ed il terzo che furono invece praticati dalla carotide. Essendo a conoscenza come il salasso possa fare aumentare il potere agglutinante dei sieri (Hahn e Langer ed altri) la quantità di sangue tolta ad ogni coniglio non superò mai i cc. 4-5 per ogni salasso; quantità che secondo i suddetti autori non è capace di determinare alcun aumento nella quantità di agglutinine. Così pure essendo noto come i processi suppurativi ed infettivi in genere possano eccitare fortemente la produzione di corpi immuni (Ramon, Lewis e Loomis ecc.) ho sempre eseguito i salassi con tutte le regole della asepsi in modo da avere nei conigli salassati dalla carotide un decorso sempre ottimo nella guarigione della ferita operatoria: l'unico coniglio, in cui, ad onta delle precauzioni suddette, la ferita suppurò, fu da me radiato dal numero degli animali in esperimento.

La titolazione del potere agglutinante dei sieri fu eseguita aggiungendo a cc. 1 del siero, nelle sue varie diluizioni, cc. 1 di una sospensione in densità opportuna di bacilli del tifo vivi in soluzione sterile di cloruro di sodio al 0,85 %. La diluizione dei sieri veniva così ad essere raddoppiata. I germi provenivano dal medesimo stipite che aveva servito per la vaccinazione e, come quelli usati per questa, erano distaccati da una patino-cultura di 20-24 ore su agar fresco. Le provette venivano lasciate in termostato a 37° C. per tre ore e per altre 12-14 ore alla temperatura di laboratorio per avere la sedimentazione del flocculato; quindi veniva eseguita la lettura col metodo macroscopico. Nei quadri

che seguono riporto i risultati delle letture eseguite in ogni provetta, premettendo che con quattro croci ho voluto indicare l'agglutinazione completa con perfetta chiarificazione del liquido sovrastante, con tre croci quella quasi completa con liquido sovrastante appena appena opalino, con due quella mediocre e con una quella scarsa. Con la tecnica presente ho eseguito anche le già menzionate ricerche preliminari.

Le ricerche di moltissimi autori, Stefani (1922), Luzzatto (1924), Dal Collo (1926), per citare solo gli italiani che hanno dimostrato come la milza abbia notevole o notevolissima importanza nella produzione di agglutinine, mi avrebbero spinto ad eseguire queste ricerche anche su conigli splenectomizzati e bloccati, come già feci per le emolisine, ma ragioni indipendenti dalla mia volontà mi hanno obbligato per ora a circoscrivere le mie ricerche sugli animali non splenectomizzati.

* * *

I sei conigli, che avevo usato per le ricerche preliminari, furono adibiti ad esperimenti di altro genere. Ho scelto quindi per le presenti ricerche altri dieci conigli tre dei quali (n. 37, 38 e 39) provenienti dallo stesso parto, come pure provenivano dallo stesso parto gli altri sette conigli (n. 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46). Per evitare al massimo anche le eventuali variazioni del potere agglutinante dipendenti da cause fisiologiche provvidi affinchè gli animali vivessero nelle stesse condizioni di alimentazione e di ambiente per tutta la durata delle ricerche (circa 4 mesi), che le femmine vivessero isolate dai maschi affinchè non si verificasse qualche gravidanza, e continuamente sorvegliai il loro stato di nutrizione e salute, che si è sempre mantenuto ottimo, eccetto che per un coniglio (n. 46), che morì nel primo mese, e per altri due uno dei quali (n. 43) dovetti radiare dai miei esperimenti quasi alla fine di questi perchè affetto da un cospicuo processo suppurativo, ed un altro (n. 42) che morì nella stessa epoca per causa che non riuscii a precisare.

Ai suddetti dieci conigli praticai tre iniezioni endovenose di cc. 0,5 di vaccino nei giorni 3-10 e 17 febbraio. Sette giorni dopo l'ultima iniezione vaccinante cioè il 24 febbraio salassai (1° salasso) tutti i conigli e titolai il potere agglutinante dei loro sieri.

Tavola I

Potere agglutinante del siero dei conigli sette giorni dopo la terza iniezione di vaccino (1° *salasso*)

Conigli N.		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Peso corporeo Kg.	3 febbr.	1,980	1,890	1,660	1,080	1,010	1,070	1,100	1,110	1,030	1,120
	24 febbr.	2,670	2,350	1,950	1,520	1,180	1,330	1,420	1,390	1,510	1,360
Diluizione dei sieri											
1 : 750		+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 1000		+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 1250		+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
1 : 1500		++	+++	+++	++	+++	++++	+++	++++	++++	++++
1 : 2000		+	+	+++	+	+++	+++	++	++++	+++	+++
1 : 4000		—	—	+++	—	+++	+	—	+++	++	+
1 : 6000		—	—	+++	—	++	—	—	+++	—	—

I risultati ottenuti dalla titolazione sono riportati insieme al peso corporeo di ciascun coniglio nella Tavola I, la quale dimostra anche chiaramente di quale entità possono essere le differenze nel potere agglutinante presentato dai vari conigli, e come nessuna relazione vi sia tra queste ed il peso corporeo dei conigli stessi.

Il 13 maggio, cioè 85 giorni dopo la terza iniezione di vaccino, praticai ai conigli un nuovo salasso (2° salasso) e titolai il potere agglutinante del loro siero, per potermi rendere conto esatto del modo col quale questo era caduto in ciascun animale.

I risultati ottenuti, riportati nella Tavola II, dimostrano chiaramente come le agglutinine del siero di tutti i conigli da me usati fossero discese ad un titolo di gran lunga inferiore a quello che presentavano nella prima titolazione, eseguita il 24 febbraio, e come la loro persistenza non fosse costantemente proporzionata al titolo raggiunto in quel tempo.

I risultati ottenuti così in questa seconda titolazione (Tav. II) mi hanno permesso di avere la sicurezza che le agglutinine erano fortemente diminuite in tutti gli animali, mentre le differenze esistenti nel potere agglutinante residuo dei vari conigli non apparivano tali da dover essere prese in particolare considerazione agli effetti delle mie ricerche. I risultati ottenuti poi nella prima titolazione (Tavola I) mi hanno permesso di dividere i conigli in due gruppi a seconda della diversa capacità reattiva da loro presentata, permettendomi così di eseguire su ciascuno di questi le ricerche comparative che mi ero proposto, e di avere la maggiore sicurezza che, ridotte al minimo le cause di errore dipendenti da differenze individuali, quelle non mi avrebbero impedito una equa interpretazione dei risultati successivi.

Fu così costituito un lotto A con i conigli contrassegnati coi n. 39, 41, 42, 44 e 45 il siero dei quali aveva raggiunto, sette giorni dopo la terza iniezione di vaccino, il titolo più alto, cioè da 1 : 2000 in sopra (Tavola I), dimostrando così in essi una maggiore reattività che negli altri conigli, contrassegnati coi n. 37, 38, 40 e 43, i quali avevano raggiunto, sette giorni dopo la terza iniezione vaccinante, il titolo agglutinante più basso, cioè tra 1 : 1250 ed 1 : 1500 e coi quali fu costituito un lotto *B*. Tra i conigli appartenenti al lotto *A* i n. 39, 42 e 44 furono sottoposti al bloccaggio ed i n. 41 e 45 furono tenuti come controlli. Tra quelli appartenenti al

Tavola II

Potere agglutinante del siero dei conigli
85 giorni dopo la terza iniezione di vaccino (2° salasso)

Conigli N.	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Peso corporeo 13 maggio Kg.	2 420	2,280	2,030	1,860	1,650	1,780	1,720	1,950	2,000
Diluizione dei sieri									
1 : 100	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
1 : 150	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	+++
1 : 200	++++	+++	++++	++	++++	++	+++	++	++
1 : 300	+++	+	++++	—	+++	—	+++	—	—
1 : 400	++	—	++++	—	+	—	+++	—	—
1 : 600	++	—	++++	—	—	—	++	—	—

lotto *B* i n. 37 e 43 furono sottoposti al bloccaggio e gli altri due, i n. 38 e 40, furono tenuti come controlli. Faccio però osservare subito che, mentre fu possibile costituire un lotto *B* con conigli che presentavano nel titolo agglutinante differenze completamente trascurabili per il mio scopo, altrettanto non fu possibile fare per il lotto *A*, poichè i conigli che ne facevano parte presentavano differenze molto forti nel loro potere agglutinante dando segno così di una diversa capacità reattiva. Per eliminare il più possibile questo inconveniente dei due conigli i n. 42 e 45, che avevano presentato ugual potere agglutinante, ma molto inferiore a quello dei compagni di lotto uno, il n. 42, fu sottoposto al bloccaggio, l'altro, il n. 45, fu adibito come animale di controllo. Di questo fatto, che ho voluto segnalare fino da ora, dovrà essere tenuto il debito conto nella interpretazione finale dei risultati.

Il 15 maggio ai conigli n. 39, 42 e 44 (lotto *A*) ed a quelli n. 37 e 43 (lotto *B*) fu praticata la prima iniezione endovenosa di cc. 4 di soluzione di Pyrrolblau. Circa un'ora dopo fu praticata loro l'iniezione endovenosa di cc. 0,5 di vaccino, la quale fu pure praticata ai conigli di controllo n. 41 e 45 (lotto *A*) e n. 38 e 40 (lotto *B*).

Successivamente ai conigli n. 39, 42 e 44 (lotto *A*) ed a quelli n. 37 e 43 (lotto *B*) furono praticate iniezioni endovenose di cc. 4 di Pyrrolblau quotidianamente dal 15 al 26 maggio compreso, cosicchè ognuno di questi conigli ricevette in dodici giorni cc. 48 di Pyrrolblau all'1,5 %.

Gli animali tollerarono benissimo questo trattamento, ciò che può anche rilevarsi dalle letture del peso corporeo che ho riportato in ogni tavola.

Il 22 maggio, cioè sette giorni dopo l'ultima iniezione di vaccino, tutti i conigli furono salassati (3° salasso) e così pure furono salassati (4° salasso) dodici giorni dopo di questa cioè il 27 maggio. I risultati ottenuti dalla titolazione del potere agglutinante dei sieri prelevati col 3° salasso sono riportati nella Tavola III; quelli ottenuti nella titolazione dei sieri provveduti col 4° salasso sono riportati nella Tavola IV.

Il 26 maggio ho sospeso, in tutti i conigli che erano stati sottoposti al bloccaggio, le iniezioni di Pyrrolblau allo scopo di potere osservare le eventuali variazioni tra il potere agglutinante

Tavola III

Potere agglutinante del siero dei conigli sette giorni dopo la 4ª iniezione di vaccino (3° salasso)

	LOTTO A					LOTTO B			
	bloccati			controlli		bloccati		controlli	
Conigli N.	39	42	44	41	45	37	43	38	40
Peso corporeo 22 maggio Kg.	1,950	1,730	1,990	1,630	1,975	2,500	1,780	2,230	1,780
Diluizione dei sieri									
1 : 500	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 1000	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 1500	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 2000	++++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 4000	++++	++	++++	+++	+++	+++	++++	+++	++
1 : 6000	++++	—	+++	—	+	—	+++	++	—

TAVOLA IV

Potere agglutinante dei sieri dei conigli
12 giorni dopo la quarta iniezione di vaccino (4° salasso)

	LOTTO A					LOTTO B			
	bloccati			controlli		bloccati		controlli	
Conigli N.	39	42	44	41	45	37		38	40
Peso corporeo 27 maggio Kg.	1,870	1,700	1,960	1,570	1,965	2,530		2,270	1,800
Diluizione dei sieri									
1 : 500	++++	++++	++++	++++	++++	++++		++++	+++
1 : 1000	++++	++++	++++	+++	++++	++++		++++	+++
1 : 1500	++++	+++	+++	+++	++++	++++		+++	+++
1 : 2000	++++	++	+++	+++	+++	+++		++	++
1 : 4000	+++	+	+++	++	++	++		++	++
1 : 6000	+++	—	+++	++	++	+		++	—

TAVOLA V

Potere agglutinante del siero dei conigli
17 giorni dopo la 4ª iniezione di vaccino (5° *salasso*)

	LOTTO A					LOTTO B			
	bloccati			controlli		bloccati		controlli	
Conigli N.	39		44	41	45	37		38	40
Peso corporeo 1º giugno Kg.	1,680		1,900	1,700	2,030	2,700		2,420	1,770
Diluizione di sieri									
1 : 500	++++		++++	++++	++++	++++		++++	++++
1 : 1000	++++		++++	+++	+++	++++		+++	++++
1 : 1500	++++		++++	+++	++	+++		+++	+++
1 : 2000	++++		++++	—	—	+++		+	++
1 : 000	++++		+++	—	—	++		—	—
1 : 6000	+++		+	—	—	—		—	—

TAVOLA VI

Potere agglutinante del siero dei conigli nelle varie titolazioni eseguite

Data dei vari salassi	LOTTO A					LOTTO B				OSSERVAZIONI
	bloccati			controlli		bloccati		controlli		
	39	42	44	41	45	37	43	38	40	
24 febbraio	1 : 6000	1 : 2000	1 : 6000	1 : 4000	1 : 2000	1 : 1250	1 : 1500	1 : 1500	1 : 1250	Dopo le 3 iniezioni di vaccino del 3, 10 e 17 febbraio.
13 maggio	1 : 600	1 : 150	1 : 150	1 : 300	1 : 150	1 : 300	1 : 400	1 : 200	1 : 150	id. id.
22 maggio	1 : 6000	1 : 2000	1 : 6000	1 : 4000	1 : 4000	1 : 4000	1 : 6000	1 : 4000	1 : 2000	Dopo la 4ª iniezione di vaccino del 15 maggio e le iniezioni quotidiane di Pyrrolblau.
27 maggio	1 : 6000	1 : 1500	1 : 6000	1 : 2000	1 : 2000	1 : 4000	—	1 : 2000	1 : 1500	id. id.
1° giugno	1 : 6000	—	1 : 4000	1 : 2000	1 : 1500	1 : 2000	—	1 : 1500	1 : 1500	Dopo la cessazione delle iniezioni di Pyrrolblau.

dei loro sieri dopo la cessazione delle iniezioni bloccanti e quello dei sieri dei conigli di controllo.

Il 1° giugno ho così nuovamente sottoposto al salasso (5° salasso) tutti i conigli e titolato il potere agglutinante dei loro sieri. I risultati sono riportati nella Tavola V.

Per rendere più facili i confronti dei risultati ottenuti nelle varie titolazioni eseguite in ogni coniglio e per poterli facilmente riferire anche ai risultati ottenuti nelle due prime titolazioni, ho creduto opportuno compilare un quadro riassuntivo (Tavola VI). Nella compilazione di questo per titolo agglutinante di ciascun siero ho considerato e preso la diluizione più elevata di questo che dava ancora agglutinazione quasi completa, quel grado di agglutinazione cioè, che, come già ho detto, nelle tavole precedenti è stato contrassegnato con tre croci, e che corrisponderebbe a quello preso in considerazione da Eisenberg e Volk nella determinazione delle unità agglutinanti.

Da un confronto superficiale dei risultati ottenuti nelle titolazioni eseguite sui sieri prelevati dal 3° e 4° salasso parrebbe che il siero dei conigli bloccati di ambedue i lotti avesse raggiunto un titolo alquanto superiore a quello raggiunto dal siero dei conigli di controllo; ciò che porterebbe ad ammettere che il blocco abbia esercitata un'azione eccitante nella produzione di agglutinine. Ma se esaminiamo analiticamente i risultati ottenuti nella 3ª e 4ª titolazione (22 e 27 maggio) e li confrontiamo con quelli ottenuti nella 1ª titolazione (24 febbraio) noi ci possiamo rendere conto che la maggiore produzione di agglutinine da parte dei conigli bloccati è in gran parte solo apparente. Infatti mentre nei conigli appartenenti al lotto *B* si è avuto realmente una produzione di agglutinine alquanto maggiore negli animali bloccati, altrettanto non è avvenuto nel lotto *A*.

In questo i risultati ottenuti nei conigli n. 42 e 45 (che per ragioni già dette devono essere considerati a parte) dimostrerebbero che il blocco abbia leggermente inibito la produzione di agglutinine, mentre quelli ottenuti nei rimanenti conigli dello stesso gruppo n. 39, 41 e 44 dimostrerebbero invece che il bloccaggio non abbia esercitata influenza alcuna sulla produzione di questi anticorpi.

In complesso adunque le differenze ottenute nei singoli casi non sono state nè molto spiccate nè costanti. Ond'è che volendo tenere in considerazione le cause di errore dovute ad eventuali differenze individuali od a cause fisiologiche (cause che io ritengo di avere ridotto ai minimi termini, ma non escluso in modo completo) e sopratutto la difficoltà di realizzare al di là di certi limiti, sempre abbastanza ampi, una valutazione del contenuto in unità agglutinanti dei sieri ad alto titolo, credo sia logico concludere dai risultati delle mie ricerche che *le ripetute iniezioni endovenose di Pyrrolblau, eseguite allo scopo di menomare le funzionalità del S.R.E., non esercitano in modo evidente nè influenza inibitrice, nè influenza eccitante sulla produzione di agglutinine pel bacillo del tifo.*

* * *

Così mentre le ripetute iniezioni di Pyrrolblau, eseguite nel coniglio allo stesso scopo, mi hanno dimostrato di essere capaci di determinare una diminuzione nella produzione di emolisine, lo stesso trattamento nella stessa specie animale ha dimostrato di non esercitare influenza manifesta sulla produzione di anticorpi agglutinanti.

Se, come ho già detto in principio, tra i numerosi ricercatori che hanno studiato come il blocco del S.R.E. influenzi la produzione dei vari anticorpi, le discordanze e le contraddizioni abbondano, nessuno di coloro (Bieling ed Isaac, Siegmund, Gay e Clark e De Nunno) che studiarono come il bloccaggio influenzi la produzione sia delle emolisine che delle agglutinine, trovò che la produzione di questi due anticorpi fosse influenzata in modo diverso dal blocco del S.R.E. Questi autori sono infatti tutti d'accordo nell'affermare che il blocco del S.R.E. esercita una maggiore o minore azione inibitrice sulla produzione di questi due anticorpi, e solo De Nunno sembra che abbia osservato che la produzione di emolisine è maggiormente inibita di quella delle agglutinine dal bloccaggio del S.R.E.

Avendo ciascuno dei suddetti ricercatori usato, tanto per la ricerca delle agglutinine che per quella delle emolisine, la stessa sostanza bloccante (ossisaccarato di ferro o trypanblau) e lo stesso procedimento, come pure io ho fatto, la diversità di risultati ai quali siamo pervenuti non è facilmente spiegabile poichè

non esiste nessuna ragione che mi permetta di attribuirla alla diversa qualità della sostanza bloccante usata. E se l'avere data poca o punto importanza alla diversa capacità reattiva, presentata dai vari conigli, può rappresentare un fattore capace di spiegare anche da solo la disparità dei risultati ottenuti dai precedenti ricercatori che si occuparono dell'argomento, questo stesso fattore non è sufficiente a spiegare il diverso comportamento nella produzione di emolisine e di agglutinine, come io solo finora ho riscontrato.

I risultati ottenuti nelle precedenti ricerche sulle emolisine credetti mi potessero autorizzare a concludere che il S.R.E., specie la parte di esso contenuta nella milza, ha parte importantissima nella produzione di ambocettori emolitici. I risultati delle presenti ricerche possono autorizzarmi ora ad escludere, sulla base di fatti negativi, la compartecipazione del S.R.E. nella produzione di agglutinine? Il diverso comportamento da me osservato nella produzione di questi due anticorpi, in seguito alla menomazione funzionale del S.R.E., mediante le iniezioni endovenose di Pyrrolblau, può autorizzarmi a ritenere che gli ambocettori emolitici e le agglutinine abbiano un diverso luogo di origine?

L'ormai dimostrata incompletezza anatomica del cosidetto blocco, la mancata dimostrazione che gli elementi del S.R.E. perdano in seguito al blocco stesso tutte le loro funzioni, e quella recentemente data da Capocaccia (1927) che le cellule istiocitarie, aventi istologicamente i caratteri di elementi bloccati, godono ancora varie proprietà tra le quali la motrice e la fagocitaria, mi obbligano ad essere molto cauto in queste risposte. Poichè non si può escludere l'ipotesi che la funzione di generare le agglutinine sia devoluta ad elementi del S.R.E. diversi da quelli deputati invece a produrre anticorpi emolitici, e proprio a quelli che si dimostrano refrattari ad infarcirsi di sostanze coloranti e colloidali; e neppure quella che la saturazione del S.R.E. da parte delle varie sostanze possa inibire la funzione di generare emolisine e non quella di generare agglutinine.

Ma se queste considerazioni mi obbligano ad essere molto cauto, come già ho detto, a rispondere alle domande suddette, non posso non rilevare che, mentre non è provato che i vari corpi immuni abbiano tutti lo stesso luogo di origine, d'altra parte esistono dei dati di fatto, dei risultati sperimentali, i quali mettono

in piena evidenza una più o meno marcata diversità di comportamento in ciò che riguarda la produzione di ambocettori emolitici e le agglutinine.

Hahn e Langer (1917) avrebbero infatti osservato come, stimolando la rigenerazione ematica, con abbondanti e ripetuti salassi, si determini nel coniglio un fortissimo aumento di agglutinine specifiche (fatto pienamente confermato da Iotten nel 1920 e da Fragomele nel 1923), mentre le emolisine non subiscono variazione alcuna e le precipitine sembrano invece diminuire lievemente.

Alessandrini e Sette (1923) riferiscono che le reiterate iniezioni di eritrociti eterogenei in animali di laboratorio, lungi dall'aumentare il titolo emolitico del siero di questi, ne determinano invece una brusca caduta e talvolta una completa scomparsa. Ciò non mi risulta che avvenga per le agglutinine, il cui titolo si ritiene che cresca all'incirca proporzionatamente al numero delle iniezioni vaccinanti ed una volta raggiunto un determinato titolo, invece di cadere o scomparire in seguito a reiniezione dello stesso vaccino, anche eseguita ad una certa distanza di tempo, sale a cifre sempre più elevate.

Oltre a queste ricerche di indole puramente sierologica ne debbo citare altre nelle quali all'indagine sierologica è stata unita quella istologica.

Megarinos Torres (1922), in conigli immunizzati contro il paratifo, avrebbe osservato che la curva agglutinante è parallela all'istituirsi di modificazioni istologiche nel midollo osseo, principalmente consistenti in una imponente generazione di elementi della serie mieloide, e ritiene quindi che la origine delle agglutinine sia strettamente connessa con queste.

Vannucci (1925) confermò questi reperti e li estese anche alla milza concludendo, anche in base ad altre ricerche sierologiche, che la produzione di agglutinine avviene negli organi emopoietici, ma che essa è funzione sopratutto della parte ematica piuttosto che della parte reticolo endoteliale.

A riguardo degli ambocettori emolitici, molto prima di loro, Mc. Gowan (1909) e Gay e Rusk (1912) eseguirono analoghe ricerche in animali inoculati con eritrociti eterogenei. Il primo trovò solamente accumuli di questi nei capillari epatici, mentre i secondi nessuna modificazione istologica osservarono dalla

quale potessero trarre qualche indirizzo sul luogo di origine degli anticorpi emolitici.

Questi dati sperimentali di natura diversa mi pare che nel loro complesso dimostrino assai chiaramente come, almeno in alcune parti, la genesi delle agglutinine presenti un comportamento diverso da quello che offre la genesi delle emolisine.

Quindi, volendo riepilogare, se la dimostrata incompletezza anatomica e funzionale del blocco può lasciare adito all'ipotesi che le agglutinine traggano la loro origine da funzioni o da elementi del S.R.E. che il blocco stesso non riesce a menomare, d'altra parte esistono dei dati sperimentali che depongono chiaramente per un comportamento molto diverso tra produzione di agglutinine e produzione di emolisine; ed esistono pure delle ricerche istologiche molto suggestive le quali, solo in animali inoculati con vaccini e non con eritrociti, hanno dimostrato modificazioni della parte ematica del midollo osseo e della milza e non della parte reticolo endoteliale di questi organi.

Ora mi pare più logico cercare una spiegazione al diverso comportamento da me riscontrato tra ambocettori emolitici ed agglutinine di fronte al bloccaggio in questi dati di fatto, che si basano in massima parte su solide dimostrazioni sperimentali, piuttosto che negli eventuali rapporti tra incompletezza anatomica e funzionale del blocco e genesi delle agglutinine i quali, lungi dal posare su dati sperimentali, sono ancora nel campo delle ipotesi. E quindi, in base ai risultati ottenuti in queste e nelle precedenti ricerche, ed in base agli altri dati sperimentali citati e discussi, siamo indotti ad ammettere logicamente *che le agglutinine originino da elementi cellulari diversi da quelli deputati alla generazione di ambocettori emolitici e, molto probabilmente, da elementi i quali non fanno parte del S.R.E.*

Conclusioni. — 1) Le ripetute iniezioni endovenose di Pyrrolblau praticate in conigli allo scopo di ottenere una menomazione funzionale del S.R.E. non esercitano influenza manifesta sulla produzione di agglutinine pel bacillo del tifo;

2) Il diverso comportamento della produzione di agglutinine e di emolisine, da me osservato in seguito al bloccaggio del S.R.E. e da altri autori osservato in altre circostanze sperimentali, è, con molta probabilità, la conseguenza della differente sede di origine

degli ambocettori emolitici da un lato e delle agglutinine dall'altro;

3) I risultati delle ricerche suesposte se non sono sufficienti a permettere di escludere con certezza qualsiasi rapporto tra S.R.E. e formazione di agglutinine non danno neppure argomento alcuno per poter ammettere la esistenza di tale rapporto.

BIBLIOGRAFIA

ALESSANDRINI e SETTE: *Annali d'Igiene*, 1923, fasc. 10, pag. 685.
ANDRIANI: *Boll. dell'Ist. Sieroterapico Milanese*, 1924, n. 6.
ASCHOFF: *Münch. Med. Woch.*, 1922, n. 69, pag. 1352.
AZZURRINI: *Lo Sperimentale*, 1906, vol. 60, pag. 493.
BENASSI: *Archivio di Patologia e Clinica Medica*, 1926, fasc. II.
BIELING ed ISAAC: *Zeitsch. f. d. ges. exp. Med.*, 1922, Bd. 26, pag. 180.
CAPOCACCIA: *Archivi di Biologia*, 1927, fasc. II, pag. 47.
CIONINI: *Giornale di Batteriol. e Immunol.*, 1927, n. 2, pag. 65.
COLLON: *C. R. Soc. Biol.*, 1927, n. 10, pag. 724.
DAL COLLO: *L'Ospedale Maggiore*, 1926, n. 11.
DE NUNNO: *Atti XXX Congr. Soc. Ital. Medicina Interna*, 1924, pag. 201.
EISENBERG e VOLK: *Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskr.*, 1902, Bd. 40, pag. 155.
FRAGOMELE: *Riforma Medica*, 1923, n. 50, pag. 1187.
FRÄNKEL e GRUNENBERG: *Zeitschr. f. ges. exp. Med.*, 1924, pag. 581.
GAY e CLARK: *Proced. Soc. exp. Biol. and. Med.*, 1924, n. 1, pag. 1.
GAY e RUSK: *Transact. Internat. Congr. Hyg. and Demogr. Wasinghton*, 1912, p. 382.
HAHN e LANGER: *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1917, n. 16, pag. 499.
HILDA HEMPL: citato da ANDRIANI.
IACHIMOGLU: citato da ANDRIANI.
IATTA: *Zeitschr. für Hygiene*, 1900, vol. 33, pag. 185.
IOTTEN: citato da VANNUCCI.
KOBAYASKI e SCHIWOTSU: *Iapan Med. World*, 1925, n. 2, pag. 27.
KOBAYASKI: *C. R. Soc. Biol.*, 1926, pag. 599.
KOWELL e TOWER: *Proced. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1926, n. 8, pag. 759.
LEWIS e LOOMIS: *The Journ. of exp. Medic.*, 1926, n. 2, pag. 263.
LUZZATTO: *Comunicazione fatta all'Acc. Fisiocritici*, Siena 6 luglio 1923.
MC GOWAN: *Journ. of Path. and. Bacter.*, 1909, vol. 14, pag. 379.
MEGARINOS TORRES: citato da VANNUCCI.
MISSIROLI: *Bollettino dell'Acc. Medica di Roma*, 1916, pag. 222.
NERI: *Lo Sperimentale*, 1916, fasc. V, pag. 469.
— *Comunicazione fatta all'Accademia Fisiocritici*, Siena 24 novembre 1916.
NEUFELD e MEYER: *Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionskr.*, 1924, pag. 595.
OKUNEFF: *Münch. Med. Wochen.*, 1921, n. 47, pag. 1537.
PFEIFFER e MARX: *Deuts. Mediz. Wochen.*, 1898, n. 3, pag. 47.
RAMON: *Annales de l'Institut Pasteur*, 1926, n. 1, pag. 1.

ROCCHI: *Rivista Ospedaliera*, 1925, n. 23-24, pag. 697.
ROSENTHAL, MOSES e PETZAL: *Klin. Wochen.*, 1924, n. 12, pag. 482.
SINGER e ADLER: *Zeitschr. f. Imm.*, 1924, pag. 468.
SIEGMUND: *Klin. Wochen.*, 1922, n. 52, pag. 2566.
STEFANI: *Lo Sperimentale*, 1922, fasc. 5-6, pag. 361.
VANNUCCI: *Lo Sperimentale*, 1924, fasc. 1-2.
— *Rivista critica di Clinica Medica*, 1924, n. 36.
— *Lo Sperimentale*, 1925, fasc. 3-4.
WARSCHATOW e LEONTYEFF: *Centralblatt. f. allg. Path. u. Path. Anat.*, 1926, Bd. 38, p. 244.

*